

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



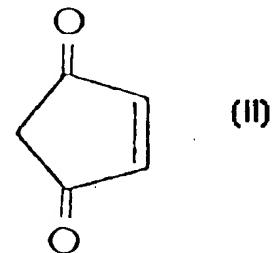
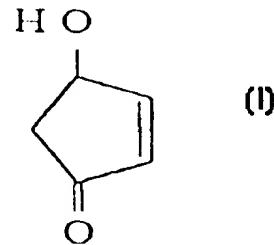
(51) 国際特許分類6 A61K 31/12	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO99/04777</b>
		(43) 国際公開日 1999年2月4日(04.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03223		
(22) 国際出願日 1998年7月16日(16.07.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/213839	1997年7月25日(25.07.97)	JP
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)[JP/JP] 小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)		

(54)Title: CARCINOSTATICS

(54)発明の名称 制がん剤

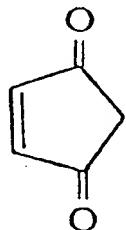
## (57) Abstract

Carcinostatics containing as the active ingredient(s) 4-cyclopenten-1,3-dione represented by formula (I) and/or 4-hydroxy-2-cyclopentenone represented by formula (II).

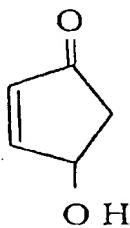


(57)要約

下記式 [ I ] で表される 4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、及び／又は下記式 [ II ] で表される 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンを有効成分とする制がん剤。



[ I ]



[ II ]

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	F I	フィンランド	L K	スリ・ランカ	S I	スロヴェニア
AM	アルメニア	F R	フランス	L R	リベリア	S K	スロヴァキア
AT	オーストリア	G A	ガボン	L S	レソト	S L	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	G B	英國	L T	リトアニア	S N	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	G D	グレナダ	L U	ルクセンブルグ	S Z	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G E	グルジア	L V	ラトヴィア	T D	チャード
BB	バルバドス	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴ
BE	ベルギー	G M	カンピア	M D	モルドヴァ	T J	タジキスタン
BF	ブルガリア・ファソ	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	G W	ギニア・ビサオ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
BJ	ベナン	G R	ギリシャ	M L	共和国	T T	トリニダッド・トバゴ
BR	ブラジル	H R	クロアチア	M N	マリ	U A	ウクライナ
BY	ベラルーシ	H U	ハンガリー	M R	モンゴル	U C G	ウガンダ
CA	カナダ	I D	インドネシア	M W	モーリタニア	U S S	米国
CF	中央アフリカ	I E	アイルランド	M X	マラウイ	U Z	ウズベキスタン
CG	コンゴー	I L	イスラエル	N E	メキシコ	V N	ヴィエトナム
CH	スイス	I N	インド	N L	ニジニール	Y U	ユーロースラビア
C I	コートジボアール	I S	アイスランド	N O	オランダ	Z W	ジンバブエ
CM	カムルーン	I T	イタリア	N Z	ノールウェー		
CN	中国	J P	日本	P L	ニュージーランド		
CU	キューバ	K E	ケニア	P T	ポーランド		
CY	キプロス	K G	キルギスタン	R O	ポルトガル		
CZ	チェコ	K P	北朝鮮	R U	ルーマニア		
DE	ドイツ	K R	韓国	S D	ロシア		
DK	デンマーク	K Z	カザフスタン	S E	スードン		
EE	エストニア	L C	セントルシア	S G	スウェーデン		
ES	スペイン	L I	リヒテンシュタイン		シンガポール		

## 明細書 制がん剤

### 発明の属する技術分野

本発明は、制がん作用、アポトーシス誘発作用等を有する特定の化合物を有効成分とする医薬用製剤に関する。

### 従来の技術

従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとは言いがたい。

これらのうち、天然物由来であるプロスタグラジンの中で、シクロペントノン環を有するプロスタグラジンA及びJ類がDNA合成を抑制することにより、安全性の高い制がん剤としての可能性が報告され、それらの各種誘導体が合成されている（特開昭62-96438号公報参照）。

また近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス（apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅）という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化されることによりプログラム死タンパク質が生合成され、またある場合には不活性型として細胞内に存在するプログラム死タンパク質が活性化される。こうして生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができれば、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

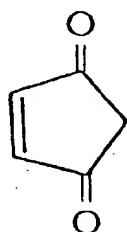
### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、5員環に $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物を有効成分とする制がん剤及びアポトーシス誘発剤を提供することにある。

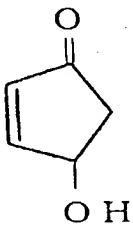
### 課題を解決するための手段

本発明者らは上記目的を達成するために銳意検討した結果、制がん作用、アポトーシス誘発作用等を有する化合物を見出し、本発明を完成させた。

本発明の第1の発明は下記式〔I〕で表される4-シクロペンテン（cyclic open-tene）-1,3-ジオン（dione）、及び／又は下記式〔II〕で表される4-ヒドロキシ（hydroxy）-2-シクロペンテノン（cyclic open-tene none）を有効成分とする制がん剤に関する。



〔I〕



〔II〕

本発明の第2の発明は上記式〔I〕で表される4-シクロペンテン-1,3-ジオン、及び／又は下記式〔II〕で表される4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンを有効成分とするアポトーシス誘発剤に関する。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において使用する式〔I〕で表される4-シクロペンテン-1,3-ジオン、式〔II〕で表される4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンはそれぞれ公知の化合物であり、公知の方法で製造することができ、また市販の化合物を使用することができる。

4-シクロペンテン-1,3-ジオンはド・ピュイ (de Puy, G. H.) らの方法 [ジャーナル オブ アメリカン・ケミカル・ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc.

.)、第82巻、第631頁、第2909頁(1960)]、ミリノフ(Mirinov, V. A.)らの方法〔ケミカル アブストラクト(Chemical Abstracts)、第73巻、18178e(1973)〕、又はキルシュケ(Kirschke)らの方法〔ジェルナール フュール プラクティッショ ヘミー(J. Prakt. Chem.)、第317巻、第807頁(1975)〕によって合成してもよいし、市販品、例えばアルドリッヂ社製品(16, 168-3)を使用してもよい。

4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンは4-シクロペンテン-1, 3-ジオンを塩化セリウム(III)又は水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって得られる。公知の合成法として、タナカ(Tanaka, T.)らの方法〔テトラヘドロン(Tetrahedron)、第32巻、第1713頁(1976)〕、ナラ(Nara, M.)らの方法〔テトラヘドロン、第36巻、第3161頁(1980)〕、及びジル(Gill, M.)らの方法〔オーストラリアン ジャーナル オブ ケミストリー(Aust. J. Chem.)、第34巻、第2587頁(1981)〕が挙げられる。4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンは(R)一体、(S)一体、及びそれらの混合物のいずれを使用してもよい。

4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンは例えばヒト前骨髓性白血病細胞HL-60、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞MOLT-3、肺がん細胞A-549、SV40形質転換肺細胞WI-38VA13、肝がん細胞He p G2、結腸がん細胞HCT 116、ヒト結腸がん細胞SW480、ヒト結腸がん細胞Wi Dr、胃がん細胞AGS、ミエローマ細胞等のがん細胞に細胞増殖抑制作用、制がん活性を有し、これらの化合物は制がん剤の有効成分として使用することができる。また、これらの化合物のがん細胞に対するアポトーシス誘発作用を有する。本発明に使用する化合物のがん細胞増殖抑制作用機作は本発明をなんら制限するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用、トポイソメラーゼ阻害作用もその作用機作に包含される。

本発明の制がん剤は、制がん作用を有する4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、及び/又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンを有効成分とし、これを

公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば製造することができる。制がん剤の製造は一般的には、これらの化合物の少なくとも一つを薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である4-シクロペントン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペントノンを希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレン glycole、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の制がん剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も含まれる。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される4-シクロペントン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペントノンの量が成人1日当たり $0.1 \mu\text{g} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取さ

せることもできる。

本発明のアポトーシス誘発剤は、アポトーシス誘発性を有する4-シクロペントン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンを有効成分とし、これを上記制がん剤に準じ、製剤化すれば製造することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

アポトーシス誘発剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される4-シクロペントン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンの量が成人1日当たり0.1 μg～2 mg／kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

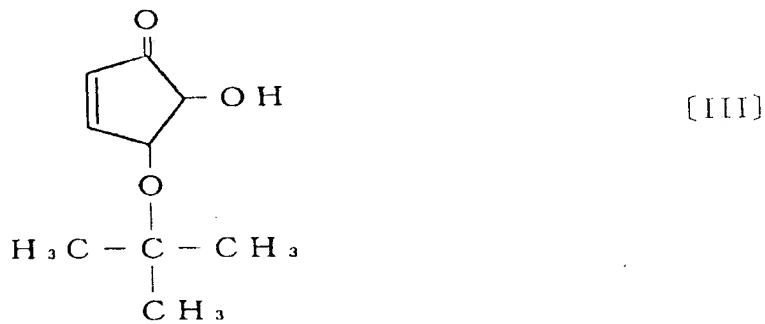
本発明のアポトーシス誘発剤は、プログラム死タンパク質によるアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができ、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて有用なものである。

即ち本発明のアポトーシス誘発剤は、自己免疫疾患患者の自己反応性リンパ球、がん細胞、ウイルス感染細胞等を排除するのに有効であり、アポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることにより、不要又は有害な細胞を自然の形で生体から排除することができる。本発明のアポトーシス誘発剤が有効な疾患としては、例えば全身性エリテマトーデス、免疫介在性糸球体腎炎、多発性硬化症、膠原病等の自己免疫疾患、リウマチ等である。

本発明のアポトーシス誘発剤はアポトーシス誘発方法に使用することができる。すなわち4-シクロペントン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンを有効成分として使用することによりアポトーシスを誘発させることができ、該方法はアポトーシス誘発機構の解明、アポトーシス誘発剤、アポトーシス誘発阻害剤のスクリーニング等に有用である。

また4-シクロペントン-1, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペン

テノンはトポイソメラーゼ阻害作用を有する。これらの化合物はいずれも  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物である。本発明者らはこの  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物のトポイソメラーゼ阻害作用を更に究明し、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物はトポイソメラーゼに対して強い阻害作用を有することを見出した。すなわち本発明により  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物を有効成分として含有するトポイソメラーゼ阻害剤も提供される。該トポイソメラーゼ阻害剤に使用する  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物としては特に限定は無く、4-シクロヘキサ-1,3-ジオニン、4-ヒドロキシ-2-シクロヘキサ-1-オニン、下記式 [III] で表される 4-*t*-ブチルシクロヘキサ-1-オニンエーテル等が例示される。



上記トポイソメラーゼ阻害剤は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物を有効成分とし、これを上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。上記トポイソメラーゼ阻害剤は正常細胞では分裂期のみに一過性に発現するが、細胞のがん化により全細胞周期を通じて高発現となるトポイソメラーゼ II を特異的に阻害し、トポイソメラーゼ II に対する選択性の高い阻害剤として有用である。またトポイソメラーゼ II の特異的阻害作用を介した制がん剤として有用である。また該トポイソメラーゼ阻害剤を使用するトポイソメラーゼ阻害方法は生化学研究や制がん剤のスクリーニング等に有用である。

本発明で使用する4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンは制がん作用、がん細胞増殖抑制作用、異常細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘発作用、トポイソメラーゼ阻害作用、滑膜細胞抑制作用等の多様な生理活性を有する化合物であり、これらの化合物を有効成分とする医薬用製剤としては、制がん剤、アポトーシス誘発剤、トポイソメラーゼ阻害剤のほか、がん細胞増殖抑制剤、異常細胞の増殖抑制剤、滑膜細胞抑制剤等を提供することができる。

本発明で使用する4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンはがん細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘発作用等を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を含有、希釈又は添加してなる食品又は飲料は制がん性、アポトーシス誘発性の食品又は飲料として有用である。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に制がん作用、アポトーシス誘発作用を有する4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、及び／又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンが含有されていれば良い。

本発明に使用する4-シクロペンテン-1, 3-ジオンは10mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。また4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンは100mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。更に4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-トープチルシクロペンテノンエーテルはそれぞれ100mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

(1) 4-シクロペンテン-1, 3-ジオン又は4-ヒドロキシ-2-シクロ

ペンテノンの250 mM、125 mM、62.5 mM、31.3 mM、15.6 mM、7.81 mM、3.91 mM、1.95 mM、977 μM、488 μM、244 μM、122 μM、61.0 μM、30.5 μM、又は15.3 μM溶液(70%エタノール水溶液中)、あるいは対照として70%エタノール水溶液を10 μlずつ96穴マイクロタイプレートの各ウェルに添加し、風乾した。前骨髓性白血病細胞株HL-60 (ATCC CCL-240) を56°C、30分間処理した牛胎児血清(JRH社製)を10%含むRPMI 1640培地(バイオウィタカー社製)に $1 \times 10^5$  個/mlとなるように懸濁し、100 μlずつ上記マイクロタイプレートの各ウェルに分注し、5%CO<sub>2</sub>存在下37°Cで48時間培養した。5 mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT;シグマ社製)リシン酸緩衝食塩水溶液10 μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール100 μlを加えてよくかくはんし、590 nmにおける吸光度を測定した。

その結果、30.5 μM 4-シクロペンテン-1, 3-ジオン添加区分(終濃度3.05 μM)、122 μM 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン添加区分(終濃度12.2 μM)においてHL-60細胞の増殖が完全に抑制され、またアポトーシス小体の形成が見られた。これらよりも高濃度を添加した区分では細胞増殖が見られず、低濃度で添加した区分では対照の70%エタノール水溶液添加区分と同等の細胞増殖が見られた。

(2) 10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地にて37°Cで培養したHL-60 (ATCC CCL-240) をRPMI 1640培地にて2.5 × 10<sup>5</sup> 個/mlとなるように懸濁した。

この懸濁液5 mlに対し、0.05 mM、0.5 mM、5 mM、50 mMの4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、0.05 mM、0.5 mM、5 mM、50 mMの4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンのそれぞれ70%エタノール溶液を10 μlずつ添加し、37°C、5%二酸化炭素存在下で、24時間培養した。

培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、最終濃度1 μM以上の4-シクロペンテン

-1, 3-ジオン、最終濃度 $10\text{ }\mu\text{M}$ 以上の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の70%エタノール溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

次いで、上記と同様の方法で24時間と48時間培養した細胞を用い、細胞工学別冊実験プロトコールシリーズアポトーシス実験プロトコール（秀潤社）129-130ページ記載の方法でF A C S c a n を用いたアポトーシス細胞の測定、イオマニュアルU Pシリーズ 最新アポトーシス実験法（羊土社）61-63ページ記載の方法でD N A の断片化の解析を行った。その結果、最終濃度 $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上の4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、最終濃度 $10\text{ }\mu\text{M}$ 以上の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン添加培養細胞にアポトーシス細胞を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、 $10\text{ }\mu\text{M}$ の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン添加培養細胞にD N A の断片化を確認した。なお対照の70%エタノール溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

(3) 実施例1-(2)と同様の方法で24時間培養した細胞を一部サンプリングし、0.4%トリパンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察し、染色されていない生細胞と青く染色された死細胞の細胞数の測定を行い、生残率が50%になる4-シクロペンテン-1, 3-ジオン及び4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンの濃度(生残率 $50\text{ }\mu\text{M}$ )を求め、表1に示した。

表 1

物 質 名	生残率 $50\text{ }\mu\text{M}$
4-シクロペンテン-1, 3-ジオン	2.55
4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン	25.5

以上より、4-シクロペンテン-1, 3-ジオン及び4-ヒドロキシ-2-

クロペンテノンは上記濃度でがん細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用を示すことが明らかとなった。

## 実施例 2

(1) 10 g の D-グルクロン酸（シグマ社製 G-5269）を 1 リットルの水に溶解し、121°Cで4時間加熱した後約 10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 混合液の上層 40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約 10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (2 × 28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで 0.2 kg/cm<sup>2</sup> に加圧し、毎分 5 ml の流速で分離を行った。1 画分当たり 10 ml になるようにフラクションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ 61 番から 80 番までの画分に高純度の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテノン-1-オノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後 40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって 100 mg の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテノン-1-オノンを得た。

(2) 44 mg の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテノン-1-オノンと 287 mg の t-ブチル (t-butyl) 2, 2, 2-トリクロロアセトイミデート (trichloroacetimidate) (アルドリッヂ社製、36, 478-9) をアルゴン気流下 2.5 ml のジクロロメタンに溶解した。これに 28 μl/m l 三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体ジクロロメタン溶液 1 ml をかくはんしながら徐々に添加した。室温で 8 時間かくはん後、減圧下濃縮し、展開溶媒としてクロロホルム：メタノール = 19 : 1 を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより 4-t-ブチルシクロペンテノンエーテルを精製した。4-t-ブチルシクロペンテノンエーテルの R<sub>f</sub> 値は 0.35 であり、収率は 9.2 % であった。

(3) α, β-不飽和カルボニル基を有する化合物として、4-シクロペンテノン-1, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン、マレイミド (アルドリッヂ社製品: 12, 958-5)、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペ

ンテン-1-オン、4-t-ブチルシクロペンテノンエーテルを用い、トポイソメラーゼ阻害活性を下記のように測定した。

(i) トポイソメラーゼII [トポジエン (T o p o G E N) 社製、2単位/ $\mu$ l] 2  $\mu$ l、10倍濃度緩衝液 [0.5M Tris-HCl (pH 8.0)、1.2M KCl、0.1M MgCl<sub>2</sub>、5mM アデノシン三リン酸、5mM ジチオスレイトール] 2  $\mu$ l、0.1% ウシ血清アルブミン (宝酒造社製) 2  $\mu$ l、蒸留水 11  $\mu$ l 及び対照の蒸留水又は水で様々な濃度に調製した4-シクロペンテン-1-, 3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン、マレイミド、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-t-ブチルシクロペンテノンエーテル 2  $\mu$ lをそれぞれ混合したものに、0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l pBR322 DNA (宝酒造社製) 1  $\mu$ lを添加して37°Cで反応させた。30分間反応後、1% ドデシル硫酸ナトリウム、50% グリセロール、0.02% ブロモフェノールブルー水溶液 2  $\mu$ lを添加して反応を停止した。

アガロースL03 (宝酒造社製) とTAE緩衝液 [40mM Tris、5mM 酢酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、酢酸でpH 7.8に調整] を用いて作製した1% アガロースゲルに上記反応液 20  $\mu$ lをアプライし、TAE緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを1  $\mu$ g/ml エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射してDNA電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に変化するが、トポイソメラーゼII活性が阻害されると超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果、水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に変化したが、50  $\mu$ M以上の4-シクロペンテン-1-, 3-ジオン、100  $\mu$ M以上の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン、1  $\mu$ M以上のマレイミド、50  $\mu$ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、500  $\mu$ M以上の4-t-ブチルシクロペンテノンエーテルによってDNAの超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合

物のトポイソメラーゼⅡ阻害活性が確認された。

(i i) 実施例2 - (3) - (i) と同様の方法で各化合物のトポイソメラーゼⅠ阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼⅡの代わりにトポイソメラーゼⅠ [トポジエン社製、0.01単位/ $\mu$ l]、10倍濃度緩衝液として100 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM EDTA、1 mM スペルミジン、50% グリセロールを用いた。

その結果、水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に変化したが、1000  $\mu$ M以上の4-シクロペンテン-1, 3-ジオン、1000  $\mu$ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、1000  $\mu$ M以上のマレイミドによってDNAの超らせん型から弛緩型への変化が一部阻害され、そのトポイソメラーゼⅠ阻害活性が確認された。

以上、正常細胞では分裂期のみに一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼⅡに対し、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物は特異的な阻害活性を示した。

### 実施例3

マウス固形がんMethA ( $2 \times 10^6$  細胞/マウス) を8週齢の雌性BALB/cマウス(体重約20g)の背部皮下に移植した。その後、引き続いて同じ箇所に5日間連続して4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン(0.3mg/kg/day, 1mg/kg/day)、4-シクロペンテン-1, 3-ジオン(0.03mg/kg/day, 0.1mg/kg/day)をそれぞれ皮下注射した。一方対照群には生理的食塩水を同様に皮下注射した。がん細胞移植後7日にマウス背部に形成されたがん組織の長径及び短径を計測し、腫瘍サイズ( $m^3$ )を長径×(短径)<sup>2</sup>/2より算出した。なお試験は一群8匹で行った。

結果を表2に示す。表2に示すように4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン及び4-シクロペンテン-1, 3-ジオンは制がん活性を示した。

表 2

群	投与量 mg/kg/day	腫瘍サイズ (mm <sup>3</sup> )		抑制率 (%)
		平均	± S.E.	
対照群		306 ± 37		—
4-ヒドロキシ- 2-シクロペンテノン 投与群	1 0.3	161 ± 67 165 ± 61		47 46
4-シクロペンテン -1, 3-ジオン 投与群	0.1 0.03	151 ± 69 150 ± 62		51 51

## 実施例 4

## 注射剤

(1) 生理食塩水（日本薬局方収載品）に4-シクロペンテノン-1, 3-ジオンを0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水（前記と同じ）に4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン及びグリシルリチニ酸をそれぞれ0.2%及び0.5%濃度で加え、注射剤を作製した。

## 実施例 5

(1) 4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノン 1 mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) 4-シクロペンテノン-1, 3-ジオン 0.1 mg、グリシルリチニ酸ジカリウム 1.0 mg及び微結晶性セルロースの適量を含有する錠剤を調製し

、糖衣を施して、錠剤を作製した。

#### 発明の効果

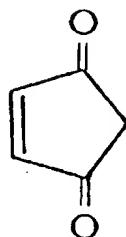
本発明により4-シクロペンテノン-1,3-ジオン、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテノンより選択される制がん作用、アポトーシス誘発作用を有する薬剤が提供される。またこれらの化合物を含有、添加及び／又は希釀してなる食品又は飲料は制がん性、アポトーシス誘発性の食品又は飲料として有用である。

更に当該化合物を含有するアポトーシス誘発剤を使用することにより、アポトーシス誘発解明の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発が可能となる。本発明の薬剤はアポトーシス誘発方法に使用することができ、この用途においても有用である。

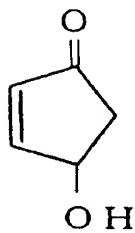
更に本発明により $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物を有効成分として含有するトポイソメラーゼII特異的阻害剤が提供され、該阻害剤は制がん剤としても有用であり、また本発明により提供される $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル基を有する化合物を有効成分として使用するトポイソメラーゼ阻害方法は生化学研究や制がん剤のスクリーニング等にも有用である。

## 請求の範囲

1. 下記式〔I〕で表される4-シクロ penten-1, 3-ジオン、及び／又は下記式〔II〕で表される4-ヒドロキシ-2-シクロ penten-1-ノンを有効成分とする制がん剤。

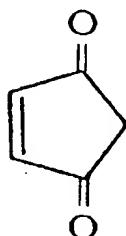


〔I〕

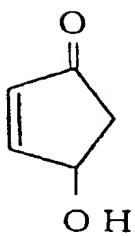


〔II〕

2. 下記式〔I〕で表される4-シクロ penten-1, 3-ジオン、及び／又は下記式〔II〕で表される4-ヒドロキシ-2-シクロ penten-1-ノンを有効成分とするアポトーシス誘発剤。



〔I〕



〔II〕

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03223

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Inayama, S. et al., "Structure and antitumor activity relation of 2-arylidene-4-cyclopentene-1,3-diones and 2-arylideneindan-1,3-diones". J. Med. Chem., 1976, Vol. 19, No. 3, pages 433 to 436	1-2
A	JP, 6-321831, A (Teijin Ltd.), 22 November, 1994 (22. 11. 94) (Family: none)	1-2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 September, 1998 (24. 09. 98)

Date of mailing of the international search report  
6 October, 1998 (06. 10. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03223

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl<sup>o</sup> A61K31/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl<sup>o</sup> A61K31/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Inayama, S. et al., 'Structure and antitumor activity relation of 2-arylidene-4-cyclopentene-1,3-diones and 2-arylideneindan-1,3-diones.' J. Med. Chem., 1976, Vol. 19, No. 3, pages 433 to 436	1-2
A	JP, 6-321831, A(帝人株式会社) 22. 11月. 1994 (22. 11. 94) (ファミリーなし)	1-2

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 09. 98

国際調査報告の発送日

06.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

森井 隆信

4C 9455



電話番号 03-3581-1101 内線 3454

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 31/12	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO99/04777</b>
		(43) 国際公開日 1999年2月4日(04.02.99)

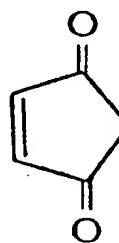
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03223	(22) 国際出願日 1998年7月16日(16.07.98)	(30) 優先権データ 特願平9/213839 1997年7月25日(25.07.97) JP	(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)	(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)[JP/JP] 小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)	(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)	

(54) Title: CARCINOSTATICS

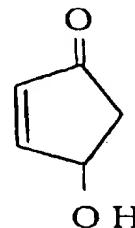
(54) 発明の名称 制がん剤

## (57) Abstract

Carcinostatics containing as the active ingredient(s) 4-cyclopenten-1,3-dione represented by formula (I) and/or 4-hydroxy-2-cyclopentenone represented by formula (II).



[ I ]

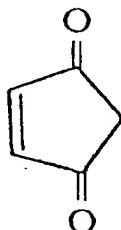


[ II ]

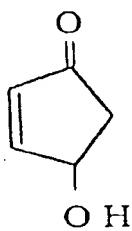
\* (PCT ガゼット No.10/1999 セクション II 参照)

(57)要約

下記式〔I〕で表される4-シクロ penten-1, 3-ジオン、及び／又は下記式〔II〕で表される4-ヒドロキシ-2-シクロ penten-1-ノンを有効成分とする制がん剤。



[I]



[II]

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG タジキスタン
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ トルクメニスタン
BF ブルガリア、フランス	GN ギニア	MG マダガスカル	TR トルコ
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TT トリニダード・トバゴ
BJ ベナン	GR ギリシャ	ML マリ	UA ウクライナ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN モンゴル	UG ウガンダ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モーリタニア	US 米国
CA カナダ	ID インドネシア	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MX メキシコ	VN ヴィニトナム
CG コンゴ	IL イスラエル	NE ニジェール	YU ユーゴースラビア
CH スイス	IN インド	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CI コートジボアール	IS アイスランド	NO ノールウェー	
CM カメルーン	IT イタリア	NZ ニュージーランド	
CN 中国	JP 日本	PL ポーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PT ポルトガル	
CY キプロス	KG キルギスタン	RO ルーマニア	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RU ロシア	
DE ドイツ	KR 韓国	SD スーダン	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SE スウェーデン	
EE エストニア	LC セントルシア	SC シンガポール	
ES スペイン	LI リヒテンシュタイン		